

Trabalho de Conclusão de Curso

**Associação de Silício Orgânico, Metilsulfonilmetano e Sulfato de
Glucosamina em Teste de Histocompatibilidade e Aplicada em
Defeitos Ósseos Mandibulares de Ratos**

Flávia Santiago de Sousa Rosa



**Universidade Federal de Santa Catarina
Curso de Graduação em Odontologia**

**Universidade Federal de Santa Catarina
Departamento de Morfologia**

Flávia Santiago de Sousa Rosa

**Associação de Silício Orgânico, Metilsulfonilmetano e Sulfato de
Glucosamina em Teste de Histocompatibilidade e Aplicada em
Defeitos Ósseos Mandibulares de Ratos**

Trabalho apresentado à Universidade Federal
de Santa Catarina, como requisito para a
conclusão do Curso de Graduação em
Odontologia

Orientador: Profa. Dra. Michelle Tillmann Biz

Co-orientador: Prof. Dr. Filipe Modolo
Siqueira

Florianópolis

2017

Flávia Santiago de Sousa Rosa

Associação de Silício Orgânico, Metilsulfonilmetano e Sulfato de Glucosamina em Teste de Histocompatibilidade e Aplicada em Defeitos Ósseos Mandibulares de Ratos

Este Trabalho de Conclusão de Curso foi julgado, adequado para obtenção do título de cirurgiã-dentista e aprovado em sua forma final pelo Departamento de Odontologia da Universidade Federal de Santa Catarina.

Florianópolis, 05 de maio de 2017.

Banca Examinadora:

Prof.^a, Dr.^a, Michelle Tillmann Biz
Orientadora
Universidade Federal de Santa Catarina

M.^a, Rúbia Teodoro Stuepp

Prof.^a, Dr.^a, Elena Riet Correa Rivero
Universidade Federal de Santa Catarina

Prof., Dr., Rogério Gondak,
Universidade Federal de Santa Catarina

Aos meus pais, e ao meu namorado por todo amor, carinho e apoio dedicados a mim para que eu pudesse chegar a essa etapa da minha vida.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus por me permitir a realização de um sonho e me dar o privilégio de no caminho ter por perto pessoas especiais que fizeram essa caminhada se tornar mais leve e prazerosa.

À minha orientadora Michelle Tillmann Biz por ter me dado a oportunidade de realizar essa pesquisa, pela confiança, orientação, apoio e conselhos que me foram dados.

Ao meu co-orientador, Filipe Modolo Siqueira por toda a sua atenção, dedicação e incentivo durante o decorrer deste trabalho.

À minha colega, colaboradora desse projeto e também membro da minha banca de TCC Rúbia Teodoro Stuepp por toda a sua atenção e por ser meu “braço direito” durante toda a pesquisa.

Aos membros da minha banca de TCC Elena Riet Correa Rivero e Rogério Gondak por terem aceitado o convite para a avaliação do meu projeto e pela oportunidade de ter trabalhado em suas companhias no Laboratório de Patologia Bucal da UFSC aprimorando os meus conhecimentos, assim contribuindo para a minha formação acadêmica.

Ao técnico do laboratório de histologia, Gilberto Domingos Marloch, pela ajuda nos cortes histológicos e coloração das lâminas.

Aos membros do LABITED (Laboratório de Bioengenharia de Tecidos Dentários), LAMEB (Laboratório Multiusuário de Estudos em Biologia), LCME (Laboratório Central de Microscopia Eletrônica) e LPB (Laboratório de Patologia Bucal), todos da Universidade Federal de Santa Catarina, pelo suporte técnico oferecido durante o desenvolvimento deste estudo.

Ao professor Alex Rafacho, por ceder espaço no biotério setorial.

Aos meus pais pelo incentivo, apoio e amor incondicional, a minha mãe Sônia que sempre me levantou e me ensinou a ser forte diante das dificuldades e ao mesmo tempo ser doce e compreensiva em frente às angústias e decepções durante toda a caminhada até aqui e ao meu pai Antônio que apesar de todas as dificuldades sempre esteve ao meu lado e me fortaleceu para que eu pudesse concluir mais um sonho na minha vida.

Ao meu namorado José Antônio por estar ao meu lado em todos os momentos, por sempre me escutar quando eu mais precisei, me dando muito carinho e incentivo.

Aos meus amigos que fizeram parte da minha formação também como pessoa, pela companhia, pelas conversas, pelas risadas que tornaram minha jornada muito mais feliz e agradável.

A todos que direta ou indiretamente fizeram parte da minha formação, o meu muito obrigada.

“Talvez não tenhamos conseguido fazer o melhor,
mas lutamos para que o melhor fosse feito.
Não somos o que deveríamos ser,
não somos o que iremos ser.
Mas, graças a Deus, não somos o que éramos”.
(Martin Luther King)

RESUMO

Os compostos de silício orgânico (SO), sulfato de glucosamina (SG) e o Metilsulfonilmetano (MSM) têm sido utilizados rotineiramente, via oral, para tratamento de problemas articulares, tendo função analgésica, anti-inflamatória e efeitos sobre o metabolismo ósseo. Sendo assim, o objetivo deste estudo foi avaliar uma composição de silício orgânico (SO), sulfato de glucosamina (SG) e MSM em teste de histocompatibilidade em dorso de rato, e posteriormente analisar o efeito de sua aplicação no processo de regeneração de defeitos ósseos mandibulares de ratos da raça Wistar. Para o teste de histocompatibilidade foram utilizados 9 ratos que receberam no dorso o implante de 2 tubos de polietileno, um contendo a composição de 70% SO + 15% SG + 15% MSM e o outro contendo guta percha (controle). As amostras foram coletadas após 7, 14 e 21 dias e processadas para inclusão em parafina e coloração em hematoxilina e eosina. Foi analisado a presença de tecido de granulação, neutrófilos, eosinófilos, linfócitos, macrófagos e abscesso. Em relação ao processo inflamatório este foi classificado como ausente, presente e infiltrado. No teste de histocompatibilidade a composição obteve boa resposta tecidual, com as amostras apresentando inflamação moderada à intensa em 7 dias e leve em 14 e 21 dias, possibilitando então o encaminhamento da mesma para ser utilizada localmente em defeitos ósseos mandibulares de ratos. Para tanto, foram utilizados 9 ratos Wistar. Um defeito ósseo com altura e profundidade de 1mm e 3mm de comprimento, no lado direito e esquerdo da mandíbula, sob a coroa do primeiro molar inferior foi realizado. No lado direito foi aplicada a composição (grupo experimental); o lado esquerdo não recebeu tratamento (controle). Após 7, 14 e 28 dias de pós-operatório as amostras foram coletadas e processadas para a análise em Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV). Nos defeitos de 7 dias as margens estavam regulares, sem presença significativa de osso novo em ambas as amostras. Aos 14 dias, no lado controle houve diminuição da profundidade do defeito; no lado tratado o defeito apresentava limites irregulares e ampla reabsorção nas margens, na cortical vestibular adjacente e na crista óssea alveolar. Aos 28 dias, no lado controle houve recobrimento do defeito por osso novo; no lado tratado houve reabsorção extensa da cortical vestibular e crista alveolar com perda dos limites do defeito. Apesar de a composição utilizada apresentar bom desempenho no teste de histocompatibilidade, sua aplicação local em defeitos ósseos mandibulares ocasionou reabsorções intensas.

Palavras chaves: histocompatibilidade, regeneração óssea, ratos wistar, silício orgânico, glucosamina, metilsulfonilmetano.

ABSTRACT

Organic silicon (OS), glucosamine sulphate (GS), and methylsulfonylmethane (MSM) have been related to bone and connective tissue health and have been considered as basic therapy for osteoarthritis disorders. The present study investigated histocompatibility of these three components in association and its application in the regeneration in mandibular bone defects in rats. Nine rats were used for histocompatibility test. In each animal was implanted the composition (70% OS + 15% GS + 15% MSM) and gutta percha (control) under the dorsal subcutaneous tissue. The samples were collected in 7, 14 and 21 days post-surgery, processed for paraffin inclusion and staining in hematoxylin and eosin, and inflammatory events analyzed. The presence of granulation tissue, neutrophils, eosinophils, lymphocytes, macrophages and abscess was analyzed. For the histocompatibility test both groups had a moderate inflammatory process in seven days post-surgery and mild inflammatory process in 14 and 21 days, allowing its application in rats mandibular bone defects. Nine rats were used for local application test. Were prepared a bone defect in the right and left mandible, under the crown of the lower first molar. The composition was engrafted in the right and bone defects without treatment (left) were the control group. The analyzes were performed after 7, 14 and 28 days post-surgery and samples were evaluated by scanning electron microscopy (SEM). In the 7 day there were no significant presence of new bone in both samples. At 14 days, on the control side there was a decrease in the depth of the defect; on the treated side the defect presented irregular borders and wide resorption in the margins and in the cortical and alveolar bone crest. At 28 days, on the control side there was an advanced bone regeneration with no more depth in the cavity with newly formed bone; on the treated side there was extensive reabsorption of the cortical vestibular and alveolar crest with loss of the defect limits. In conclusion, although the composition had positive result in the histocompatibility test, its direct application in mandibular bone defects caused intense resorption.

KEYWORDS: bone regeneration, glucosamine sulphate, methylsulfonylmethane, organic silicon.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Posicionamento das lojas cirúrgicas no dorso do rato.....	34
Figura 2 - Esquema gráfico do defeito ósseo.	37
Figura 3 - Análise de Histocompatibilidade	41
Figura 4 - Análise de microscopia eletrônica de varredura (MEV).....	43

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Análise histológica da resposta tecidual nos períodos analisados.	40
Tabela 2 – Nível inflamatório causado pelos compostos durante os períodos analisados	40

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

Bio-Oss	Osso Bovino Inorgânico (do inglês: inorganic bovine bone)
BMP-2	Proteína Morfogenética Óssea (do inglês: bone morphogenetic protein)
CEUA	Comissão de Ética no Uso de Animais
Kappa B	Fator de Transcrição Nuclear
LABITED	Laboratório de Bioengenharia de Tecidos Dentários
LCME	Laboratório Central de Microscopia Eletrônica
LAMEB	Laboratório Multiusuário de Estudos em Biologia
LPB	Laboratório de Patologia Bucal
MEV	Microscopia Eletrônica de Varredura
MSM	Metilsulfonilmetano
PRP	Plasma Rico em Plaquetas
SO	Silício Orgânico
SG	Sulfato de Glucosamina
UFSC	Universidade Federal de Santa Catarina

LISTA DE SÍMBOLOS

°	grau
μm	micrómetro
ml	mililitro
g	grama
cm	centímetro
%	porcentagem
®	marca registrada comercial
β	beta
mm	milímetro
SiO ₂	sílica

SUMÁRIO

1.	INTRODUÇÃO.....	25
2.	REVISÃO DA LITERATURA	27
3.	OBJETIVOS.....	31
3.1	Objetivo Geral.....	31
3.2	Objetivos Específicos	31
4.	METODOLOGIA	33
5.	RESULTADOS	39
6.	DISCUSSÃO.....	45
7.	CONCLUSÃO	47
	REFERÊNCIAS.....	49
	ANEXO 1.....	53

1 INTRODUÇÃO

A regeneração óssea tem sido um grande desafio na prática clínica. O uso de osso autógeno como material de enxerto é o padrão-ouro (Nampo *et al.*, 2010). Entretanto, os procedimentos cirúrgicos relacionados para coletar o material ósseo de transplante são bastante invasivos e, portanto, materiais de transplante artificial para regeneração óssea, como hidroxiapatita, fosfato β -tricálcico e Bio-Oss®, ou engenharia de tecidos são comumente sugeridos e utilizados (Hossain *et al.*, 1996; Yoshioka *et al.*, 2012; Schulz *et al.*, 2015; Verrier *et al.*, 2016). Neste contexto, o silício orgânico na dieta tem mostrado influências positivas no metabolismo do tecido ósseo e conjuntivo (Jugdaohsingh, 2007); enquanto o sulfato de glucosamina e metilsulfonilmetano (MSM) em tratamento oral como possibilidade no tratamento de distúrbios da osteoartrose (Gregory *et al.*, 2008), e por isso poderiam ser pensados como possibilidades de terapias para a regeneração óssea.

Após o oxigênio, o silício é o elemento mais abundante na terra, e a maior parte do silício existe como sílica (SiO_2) (Epstein, 1999). Evidências sugerem que o silício na dieta é benéfico para a saúde óssea e tecido conjuntivo, com associações benéficas entre a ingestão de silício e o aumento da densidade mineral óssea (Jugdaohsingh, 2007). A privação de silício na dieta de ratos tem mostrado afetar o colágeno em diferentes estágios no desenvolvimento ósseo, enzimas formadoras de colágeno, deposição de colágeno em outros tecidos, e teria implicações na cicatrização de feridas e na formação óssea (Seaborn e Nielsen, 2002). O estudo *in vitro* demonstrou que o uso de ácido ortossilícico em concentrações fisiológicas estimula a síntese do colágeno tipo 1 em células semelhantes a osteoblastos humanos e melhora a diferenciação osteoblástica (Reffitt *et al.*, 2003).

A glucosamina está presente em todos os tecidos humanos. Participa da síntese de glicosaminoglicano, proteoglicano e ácido hialurônico, todos presentes no tecido ósseo. Formulado como sulfato de glucosamina, tem sido considerado como terapia básica para o tratamento de distúrbios de osteoartroses degenerativas primárias ou secundárias (D'ambrosio *et al.*, 1981; Matheson e Perry, 2003; Bruyere *et al.*, 2004). Em mulheres pós-menopáusicas com artrose o uso farmacológico de sulfato de glucosamina tem um efeito modificador da doença (Bruyere *et al.*, 2004), proporciona alívio sintomático eficaz para

pacientes com osteoartrite e demonstra resultados promissores na modificação da progressão da artrite durante um período de 3 anos (Matheson e Perry, 2003).

Metilsulfonilmetano (MSM), também conhecido como dimetilsulfona e metil sulfona, é uma fonte natural de enxofre orgânico que ocorre em pequenas quantidades em algumas plantas verdes, frutas, legumes e grãos. O MSM possui propriedades antioxidantes e anti-inflamatórias (Kim *et al.*, 2009) e tem sido utilizado (em combinação com glucosamina e condroitina) para tratar ou prevenir a osteoartrite (Gregory *et al.*, 2008). In vitro, a combinação de MSM com BMP-2 aumentou o nível de expressão de genes marcadores de diferenciação de osteoblastos e, assim, pode promover a diferenciação de células-tronco mesenquimais em osteoblastos (Kim *et al.*, 2016).

Levando em consideração os efeitos benéficos do tratamento de silício orgânico, sulfato de glucosamina e MSM relacionados ao tecido ósseo, o presente estudo investigou o efeito de aplicação local desses três componentes em defeitos ósseos mandibulares de ratos.

2. REVISÃO DA LITERATURA

De Mendonça Costa (2008) definiu a reparação óssea como o reestabelecimento da continuidade de tecidos defeituosos por outros tecidos que não têm capacidade de substituir funcionalmente e estruturalmente o tecido lesado, enquanto a regeneração óssea pode ser definida como um processo biológico complexo de renovação da arquitetura e função do tecido ósseo perdido (De Mendonça Costa *et al.*, 2008).

Atualmente as técnicas de enxerto são a opção terapêutica mais comumente utilizada para a regeneração óssea. Dentre estas, há a possibilidade de se utilizar um material enxertivo sintético, autólogo (do próprio paciente), homólogo (osso proveniente de outro paciente) ou xenógeno (osso proveniente de outro animal, por exemplo, osso bovino) (Rokn *et al.*, 2012). Diversos estudos apontam o material autógeno como sendo a melhor opção, uma vez que este é o único material que possui os três requisitos considerados essenciais para um material enxertivo: osteoindução, osteocondução e osteogênese (Nampo *et al.*, 2010). Entretanto, há de se considerar que esta técnica apresenta a necessidade de uma segunda cirurgia para a colheita do material enxertivo, tendo, às vezes, difícil acesso ao sítio doador, possibilidade de infecções, complicações e outras morbidades (Yoshioka *et al.*, 2012).

Levando em conta essas intercorrências percebeu-se a necessidade de busca de outras formas de tratamento. O uso de materiais sintéticos, como a hidroxiapatita, é amplamente conhecido e utilizado e mostra resultados positivos, embora não tão bons quanto aqueles do enxerto autógeno. Uma das vantagens desta técnica é não implicar em morbidades, risco de infecção e cirurgia adicional como o enxerto autógeno, além de não apresentar risco de transmissão de doenças, é um material de fácil acesso e de quantidade ilimitada (Rokn *et al.*, 2012).

O uso de Plasma Rico em Plaquetas (PRP) também é relatado como uma modalidade terapêutica na regeneração óssea. Por ser um material autógeno, também não implica em rejeição e possibilidade de transmissão de doenças, além disso, é fácil de ser obtido e manipulado. Entretanto, apresenta resultados positivos, mas que não alcançam aqueles apresentados pelo enxerto autógeno (Marx, 2004).

Apesar das evidências científicas positivas sobre os enxertos ósseos e terapêuticos já utilizados na Odontologia para a regeneração óssea, a busca por um bom material que possa contribuir para a regeneração do tecido ósseo é uma constante. Dentro deste contexto, o

silício orgânico, sulfato de glucosamina e o metilsulfonilmetano (MSM) têm surgido como opções de tratamento para osteoartrites, o que suscita a possibilidade de sua utilização para a regeneração óssea em si.

O silício é um dos elementos mais abundantes na crosta terrestre, ocorrendo principalmente no mineral inerte das areias, a sílica (SiO_2), bem como na caulinita e outros minerais de argila (Epstein, 1999). As evidências acumuladas ao longo dos últimos 30 anos, sugerem fortemente que o silício na dieta é benéfico para a saúde óssea e tecido conjuntivo e, recentemente, foram relatadas fortes associações positivas entre a ingestão de silício na dieta e densidade mineral óssea (Jugdaohsingh, 2007). Um experimento feito com ratos mostra que a privação de silício afeta o colágeno em diferentes fases do desenvolvimento ósseo, enzimas formadoras de colágeno e na deposição do colágeno nos tecidos, mostrando as implicações do silício para a cicatrização e regeneração óssea (Seaborn e Nielsen, 2002).

Em muitos casos a reabsorção óssea acontece devido a injúrias, defeitos congênitos ou patologias em geral, mas a perda de osso também pode ocorrer de maneira fisiológica devido ao envelhecimento. Um estudo realizado em mulheres com osteoporose demonstrou um aumento da densidade mineral óssea principalmente na região do quadril após a suplementação farmacológica com silício (Jugdaohsingh *et al.*, 2004). Hoje se sabe que a deficiência de silício pode levar a defeitos ósseos, por consequência esse elemento pode desempenhar um papel importante no nosso metabolismo. Em outro estudo feito com silício em sua forma hidrossolúvel, o ácido ortossilícico, comprovou que sua utilização em concentrações fisiológicas estimula a produção de colágeno tipo I em células semelhantes a osteoblastos aumentando a diferenciação osteoblástica (Reffitt *et al.*, 2003).

A glucosamina é um glicosaminoglicano com constituintes básicos das unidades dissacarídicas que compõem os proteoglicanos. Isolados ou em associação são utilizados no tratamento dos processos degenerativos articulares (D'ambrosio *et al.*, 1981; Matheson e Perry, 2003; Bruyere *et al.*, 2004). Em estudo realizado em coelhos a associação de sulfato de glucosamina e sulfato de condroitina promoveu diminuição do tempo de reparo ósseo em fratura induzida em relação ao grupo controle (Silva Junior, 2007). Além de auxiliar na regeneração óssea a associação de sulfato de glucosamina e sulfato de condroitina reduz a hipernocicepção em modelo experimental de osteoartrite (Silva Junior, 2007).

Outra substância que chama a atenção na área de recuperação celular é o metilsulfonilmetano (MSM). Ele ocorre

naturalmente em pequenas quantidades em algumas plantas verdes, frutas e vegetais e nas glândulas adrenais humanas. MSM tem sido estudado por ter efeito anti-inflamatório e analgésico. MSM é frequentemente encontrado na forma terapêutica em combinação com outros suplementos, como a glucosamina (Gregory *et al.*, 2008). Um estudo demonstra que a combinação de MSM com BMP-2 aumenta significativamente a diferenciação osteogênica e mineralização, ou seja, auxilia o processo de estimulação da diferenciação das células tronco mesenquimais em osteoblastos (Kim *et al.*, 2016). Além disso, outro estudo revela que o MSM inibe drasticamente o crescimento de células de tumor hepático (Kim *et al.*, 2014). Em pesquisa foi comprovado que MSM possui um efeito hepatoprotetor contra lesão hepática induzida em ratos, que pode ser justificado por suas propriedades antioxidantes, anti-inflamatórias e anti-apoptóticas (Kamel e El Morsy, 2013).

Levando em considerações os efeitos benéficos do silício orgânico, sulfato de glucosamina e o MSM em tratamentos de patologias que estão relacionadas com o tecido ósseo, surge a hipótese de associar estes componentes para uma utilização local em casos de lesão óssea. Para tanto, a composição de silício orgânico, sulfato de glucosamina e MSM foi utilizada em teste de histocompatibilidade e aplicada em defeitos ósseos mandibulares de ratos buscando avaliar o processo de regeneração óssea.

3. OBJETIVOS

3.1 Objetivo Geral

Foi objetivo deste estudo avaliar a histocompatibilidade de silício orgânico, glucosamina e MSM e sua aplicação local em defeitos ósseos mandibulares de ratos.

3.2 Objetivos Específicos

- Realizar o teste de histocompatibilidade, em dorso de ratos, da composição de silício orgânico associado à glucosamina e MSM;
- Avaliar em microscopia eletrônica de varredura o efeito da aplicação da composição de silício orgânico, sulfato de glucosamina e MSM em defeitos ósseos mandibulares de ratos.

4. METODOLOGIA

4.1 Questões éticas

Esta pesquisa foi aprovada pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA), sob o protocolo PP0848 (Ofício nº 114/CEUA/PROPESQ/2013) (Anexo 1).

4.2 Protocolo cirúrgico para análise de histocompatibilidade

Foram obtidos dois tubos de 5 mm de comprimento e 1,3 mm de diâmetro interno a partir de um tubo de polietileno 19G (Venescalp, Feira de Santana, Ba, Brasil), os quais são atóxicos e esterilizados. Estes tubos serviram de arcabouço para a colocação da composição a ser analisada e do controle.

Foram utilizados 9 ratos machos da espécie *Rattus norvegicus* da linhagem wistar machos pesando entre 200 e 300 gramas de aproximadamente 3 meses de idade, divididos em 3 grupos de 3 animais: observação de 7, 14, e 21 dias pós-implante. Para tanto, os animais foram anestesiados com uma combinação de Ketamina 5% e Xilazyna 2%, injetados na cavidade peritoneal (0,3ml/100g). Após a anestesia o animal foi colocado na mesa cirúrgica com o dorso voltado para cima e estabilizado com o auxílio de elásticos que fixam os membros superiores e inferiores à mesa, foi passada uma pomada de vaselina nos olhos para evitar o ressecamento do globo ocular e colocação do campo cirúrgico. Realização de tricotomia e antisepsia com álcool iodado a 5% (VicoFarma, Lages, SC, Brasil).

Uma incisão utilizando uma lâmina de bisturi número 15 (Solidor, Barueri, SP, Brasil) foi realizada na linha média com o objetivo de atingir somente a região subcutânea. Com o uso de uma tesoura de ponta romba do tipo Metzembbaum os tecidos foram divulsionados lateralmente para a obtenção de 2 lojas cirúrgicas, sendo uma para a colocação da composição (loja A) e a outra para a colocação do controle (loja B) (Figura 1).



Figura 1: Posicionamento das lojas cirúrgicas no dorso do rato.

Tomou-se o cuidado para que essas lojas cirúrgicas possuíssem uma distância de no mínimo 1 cm da incisão para não ocorrer a interferência da cicatrização do corte na avaliação, e entre os 2 tubos implantados esta distância mínima foi de 2cm.

A composição de silício orgânico, glucosamina e MSM foi preparada por um segundo operador no momento da cirurgia. Para isto, foram utilizadas espátula, placa de vidro e a composição foi manipulada na proporção de 0,2g de pó diluído em 50 microlitros de soro fisiológico. Em seguida foi introduzida no tubo com movimento de pressão do próprio tubo contra a placa de vidro. O excesso de material foi removido com espátula e limpo com soro fisiológico para depois o tubo ser inserido na loja cirúrgica. Para o grupo controle, foi utilizado o tubo de polietileno preenchido com guta percha. Para tanto, cones de guta percha número 80 previamente desinfetados em hipoclorito de sódio 1% por 5 minutos foram introduzidos nos tubos e as extremidades dos mesmos foram seladas com a guta percha. Abaixo se encontra a relação das substâncias que foram utilizadas nas duas lojas cirúrgicas:

- . Loja A: 70% silício orgânico, 15% de glucosamina, 15% de MSM;
- . Loja B: guta percha (controle);

Durante a inserção do tubo no dorso do animal, tomou-se o cuidado do mesmo estar paralelo a linha média de incisão. Após implantação dos 2 tubos teste a sutura foi realizada com ponto simples

utilizando fio de sutura reabsorvível do tipo Catgut 4-0 (Ethicon, Johnson & Johnson, São Paulo, SP, Brasil). Os animais foram mantidos isolados em gaiolas, as quais receberam a identificação correspondente, e foram mantidos sob ideais condições de alimentação e temperatura, preservando o máximo possível as situações a que eles estão habituados.

4.3 Análise de histocompatibilidade

Decorrido o tempo de análise de 7, 14 e 21 dias foi realizada a coleta das amostras. Para tanto, os animais foram sacrificados por sobredosagem de anestésico (Ketamina 5% e Xilazyna 2%). Com o auxílio de uma tesoura de ponta romba, o tecido do dorso contendo os tubos foi removido respeitando-se uma margem de segurança suficiente para observar as respostas teciduais adjacentes às composições testadas. As amostras foram fixadas em formol 10% tamponado (Meyako do Brasil, Guarulhos, SP, Brasil) por no mínimo 24 horas. Decorrida a fixação, foi realizada a redução da amostra e remoção do tubo. Para isto, foi utilizada uma lâmina de bisturi numero 15 (Solidor, Barueri, SP, Brasil), sendo realizada uma incisão longitudinal no centro do tubo, o qual foi removido com o auxílio de uma cureta.

As amostras foram encaminhadas para o processamento histológico de rotina para inclusão em parafina. Cortes semi-seriados de 3µm foram obtidos e as lâminas coradas com Hematoxilina e Eosina. As lâminas tiveram suas identificações ocultadas e as imagens foram capturadas com câmera de 3.3 megapixel software Q-capture Pro 5.1 (Q-imaging, BC, Canada).

A análise celular foi realizada em aumento de 400x em microscópio óptico e em toda a extensão da lâmina, considerando os eventos presentes no tecido da extremidade dos tubos.

As lâminas foram classificadas de acordo com uma avaliação qualitativa (Figueiredo *et al.*, 2001), onde foi observada a presença de:

- Tecido de granulação
- Neutrófilo
- Eosinófilo
- Linfócito
- Macrófago e célula gigante
- Abscesso

Com base nesses achados as lâminas foram classificadas de acordo com os seguintes escores:

- 0 - Ausência
- 1- Presença
- 2- Infiltrado

Para os eventos celulares, foi considerado escore 0 (Ausência) quando as células inflamatórias estiverem ausentes ou estiverem presentes no interior de vasos sanguíneos. Foi considerado escore 1 (Presença) quando as células estiverem presentes de maneira esparsa, ou em grupamentos muito reduzidos. E, foi considerado escore 2 (Infiltrado) quando, em área próxima a extremidade do cilindro, as células dominarem o campo ou estiveram em número elevado configurando maior severidade.

Quanto ao abscesso, recebeu escore 0 (Ausência) quando estiver ausente, 1 (Presença) quando o mesmo estiver limitado à proximidade do cilindro contendo o material em estudo, enquanto que o valor 2 (Infiltrado) foi dado para o caso de o mesmo atingir áreas mais distantes.

Levando em consideração o tecido e a celularidade dos eventos avaliados, a inflamação foi classificada em (Figueiredo *et al.*, 2001):

- 0 - Ausente
- 1 - Leve
- 2- Moderado
- 3- Intenso

As análises foram realizadas por um examinador experiente, cegado e com as lâminas codificadas. O código foi quebrado apenas após a pontuação ter sido concluída.

4.4 Protocolo cirúrgico para a aplicação da composição nos defeitos ósseos mandibulares de ratos

Para este procedimento foram utilizados 9 ratos machos da espécie *Rattus norvegicus* da linha wistar, pesando entre 200 e 300 gramas com aproximadamente 3 meses de idade divididos em 3 grupos de observação: 7, 14 e 28 dias pós-cirurgia.

Para tanto, os animais foram anestesiados com uma combinação de Ketamina 5% e Xilazyna 2%, injetados na cavidade peritoneal (0,3ml/100g). O animal foi posicionado em decúbito dorsal e estabilizado na mesa cirúrgica com a ajuda de elásticos para melhor

fixação dos membros inferiores e superiores e foi aplicada vaselina nos olhos. Realizou-se a antisepsia extra e intra oral utilizando gaze e álcool iodado a 5% (VicoFarma, Lages, SC, Brasil).

Foi realizada uma incisão localizada na mucosa logo abaixo do primeiro molar inferior com uma lâmina de bisturi número 15 (Solidor, Barueri, SP, Brasil). Com uma espátula de inserção de resina realizou-se a divulsão dos tecidos moles e periósteo. Os defeitos ósseos foram confeccionados com uma broca esférica carbide número 1 em baixa rotação sob irrigação constante com água destilada, causando um defeito ósseo com medidas aproximadas de 1mm de profundidade, 1 mm de altura e 3mm de largura (Figura 2).

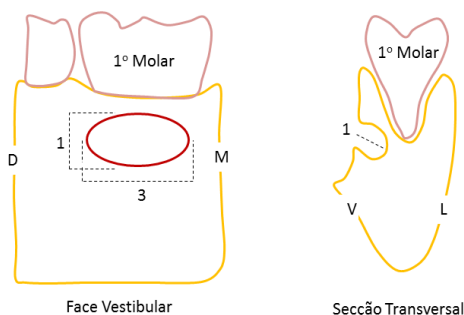


Figura 2: Esquema gráfico do defeito ósseo. Vista vestibular e de secção transversal da mandíbula na área de confecção do defeito ósseo. Linha vermelha circular: defeito ósseo de 1mm de altura e 3mm de comprimento abaixo da coroa do primeiro molar inferior. Na secção transversal, a profundidade do defeito foi de 1mm. (D) face distal; (M) face mesial; (V) face vestibular; (L) face lingual.

O procedimento de sutura dos tecidos moles com fio catgut 4-0 foi iniciado transpassado na gengiva e antes do fechamento completo o fio foi afrouxado para afastar os bordos da incisão e expor o defeito ósseo para aplicação da composição silício orgânico, MSM e Glucosamina. A composição foi então manipulada conforme descrito previamente e colocada no interior do defeito ósseo na mandíbula do lado direito do animal com o auxílio de uma seringa de insulina sem

agulha. Após a aplicação da composição, a sutura foi finalizada. O lado esquerdo sofreu o mesmo protocolo cirúrgico, porém sem a aplicação da composição, sendo considerado o lado controle.

4.5 Coleta, processamento e análise das amostras de defeitos ósseos para MEV

Cada grupo de 3 animais com tempos pós-cirúrgicos diferentes de 7, 14 e 28 dias foram sacrificados com sobredosagem de anestesia (Ketamina 5% e Xilazina 2%) e seguiu-se a coleta da hemimandíbula direita e esquerda sendo feita a retirada do excesso de tecido mole aderido ao osso com o auxílio de tesoura, porta agulha e lâmina de bisturi número 15. Após a coleta a peça foi armazenada imersa em hipoclorito de sódio 1% por 24 horas e em seguida hidratada com soro fisiológico por 1 hora. A desidratação da peça ocorreu com sua imersão em uma sequência crescente de etanol, iniciando com 30% e finalizando com dois banhos de 100% por 30 minutos cada. A amostra manteve-se em temperatura ambiente para secar.

A amostra foi reduzida à região mesio-distal do primeiro molar inferior e um pincel artístico número 12 da marca tigre e jatos de ar sobre a superfície da amostra foram aplicados para remover resíduos provenientes da redução. Em seguida realizou-se o processamento para análise em MEV JOEL JSM-6390LV (Joel Ltd, Tokyo, Japan). As amostras foram fixadas no suporte com a superfície vestibular do processo alveolar voltada para o campo de captura, de forma a analisar todo o diâmetro do defeito ósseo em cada amostra.

As amostras tiveram sua identificação mascarada de forma que a captura e análise fossem realizadas por um examinador cegado quanto ao grupo a que cada uma pertence. Na avaliação foi realizada a análise descritiva do processo de regeneração óssea em cada grupo, levando em consideração o defeito ósseo, a qualidade do osso neoformado e o padrão de deposição óssea.

5. RESULTADOS

5.1 Análise da histocompatibilidade em dorso de ratos

Os resultados da análise histológica estão presentes nas tabelas 1-2. A Figura 3 mostra secções histológicas das amostras durante o período analisado.

A composição de SO+SG+MSM criou um tecido de granulação mais severo em 7 dias de pós-operatório, em relação ao grupo controle (presença leve). Em 14 dias, a composição teve uma redução da presença do tecido de granulação. Em 21 dias, não havia tecido de granulação.

Em 7 dias de pós-operatório houve presença leve de infiltrados de linfócitos com SO+SG+MSM e severa no grupo controle. Em 14 e 21 dias, a composição e o controle apresentaram uma leve presença de infiltrados de linfócitos.

A presença de macrófagos e células gigantes foi mínima em 7 dias e reduziu a zero a partir de 14 dias em ambos os grupos.

A composição não teve resultados significativos em relação a presença de neutrófilos, eosinófilos, formação de abscessos e fibroplasia em qualquer período analisado.

Quanto ao nível inflamatório causado pela composição durante os períodos analisados, SO+SG+MSM apresentou moderado processo inflamatório em 7 dias, assim como o controle. Em 14 dias, tanto a composição como o grupo controle testados atingiram um processo inflamatório leve, mantendo-se assim até 21 dias. Tendo em consideração estes resultados, SO+SG+MSM foi considerada uma composição com um bom resultado de histocompatibilidade para seguir para a próxima etapa de aplicação local em defeitos ósseos mandibulares de ratos.

Tabela 1 Análise histológica da resposta tecidual nos períodos analisados

<u>Análise</u>	<u>7 dias</u>						<u>14 dias</u>						<u>21 dias</u>					
	<u>SO+SG+</u>			<u>Guta</u>			<u>SO+SG</u>			<u>Guta</u>			<u>SO+S</u>			<u>Guta</u>		
	<u>MSM</u>			<u>Percha</u>			<u>+MSM</u>			<u>Percha</u>			<u>G+MS</u>			<u>Percha</u>		
	<u>M</u>																	
	0	1	2	0	1	2	0	1	2	0	1	2	0	1	2	0	1	2
<u>Granulação</u>	-	-	3	-	2	1	2	-	-	2	1	-	2	-	-	1	1	-
<u>Neutrófilo</u>	3	-	-	3	-	-	2	-	-	3	-	-	2	-	-	2	-	-
<u>Eosinófilo</u>	3	-	-	3	-	-	2	-	-	3	-	-	2	-	-	2	-	-
<u>Linfócito</u>	-	2	1	-	1	2	-	2	-	-	3	-	-	2	-	-	2	-
<u>Macrófago</u>	2	1	-	3	-	-	1	1	-	3	-	-	2	-	-	2	-	-
<u>Abcesso</u>	3	-	-	3	-	-	2	-	-	3	-	-	2	-	-	2	-	-

Número de amostras em cada evento analisado; (0) ausência, (1) presença leve, (2) presença severa; SO: silício orgânico; SG: sulfato de glucosamina; MSM: Metilsulfonilmetano

Tabela 2 Nível inflamatório causado pelos compostos durante os períodos analisados

	<u>SO+ SG +MSM</u>				<u>Guta Percha</u>			
	<u>0</u>	<u>1</u>	<u>2</u>	<u>3</u>	<u>0</u>	<u>1</u>	<u>2</u>	<u>3</u>
<u>7 dias</u>	-	-	<u>3</u>	-	-	-	<u>2</u>	<u>1</u>
<u>14 dias</u>	-	<u>2</u>	-	-	-	<u>3</u>	-	-
<u>21 dias</u>	-	<u>2</u>	-	-	-	<u>2</u>	-	-

Número de amostras em cada nível inflamatório classificado; (0) ausência, (1) leve, (2) moderado; (3) intenso; SO: silício orgânico; SG: sulfato de glucosamina; MSM: Metilsulfonilmetano

|

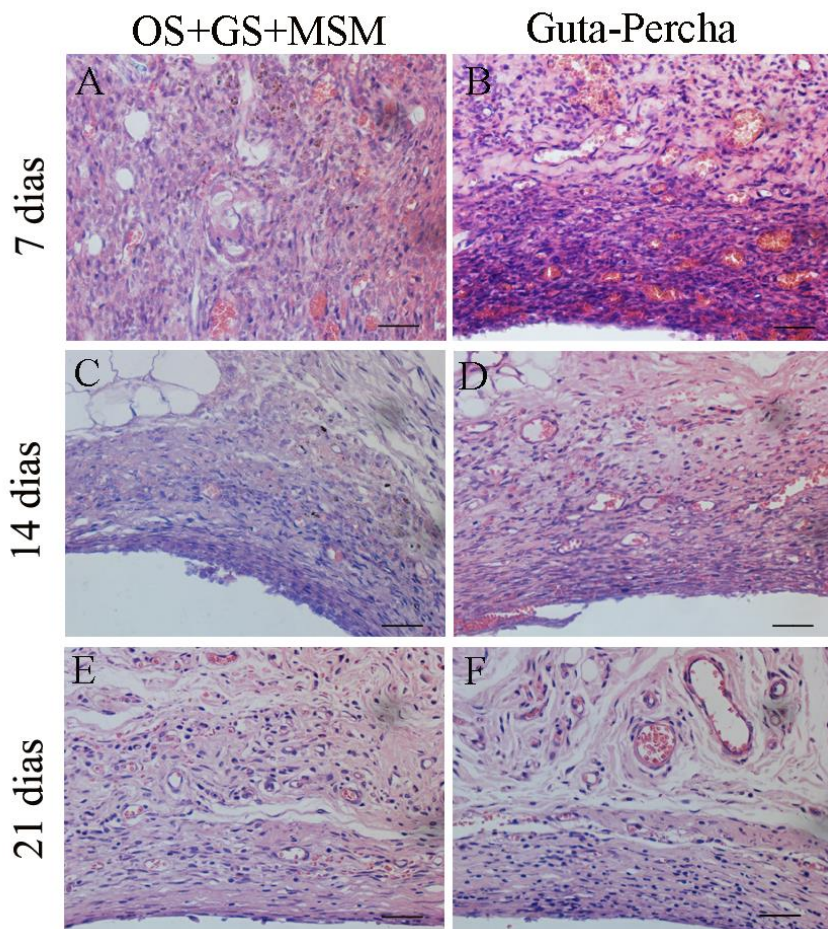


Figura 3. Análise de Histocompatibilidade. A-B: 7 dias após a cirurgia; C-D: 14 dias após a cirurgia; E-F: 21 dias após a cirurgia. SO+SG+MSM: silício orgânico + sulfato de glucosamina + metilsulfonilmetano (A, C e E); Guta-Percha: grupo controle (B, D e F). Colaração com Hematoxilina e eosina. Bares: 40um.

5.2 Resultado da cirurgia de defeito ósseo e análise em MEV

Em todas as amostras foi observado exposição radicular decorrente do defeito ósseo confeccionado.

Aos 7 dias de pós-operatório, o grupo controle exibiu um defeito mandibular com margens regulares e pequena quantidade de osso recém formado no fundo da cavidade. (Figura 3). No grupo experimental houve alguma reabsorção nas bordas do defeito criado, com reabsorção superficial externa leve na raiz do dente.

Em 14 dias, o grupo controle teve uma diminuição na profundidade do defeito por nova deposição óssea. O grupo experimental teve grande quantidade de reabsorção no osso cortical alveolar adjacente, crista alveolar e reabsorção externa na raiz do dente.

O grupo controle teve, em 28 dias de pós-operatório, defeitos ósseos rasos com bordas regulares e cavidade óssea preenchida com osso novo conectado ao osso antigo adjacente. O grupo experimental teve uma reabsorção intensa no osso alveolar cortical e da crista, com perda dos bordos do defeito, grande reabsorção externa na raiz do dente e sua exposição.

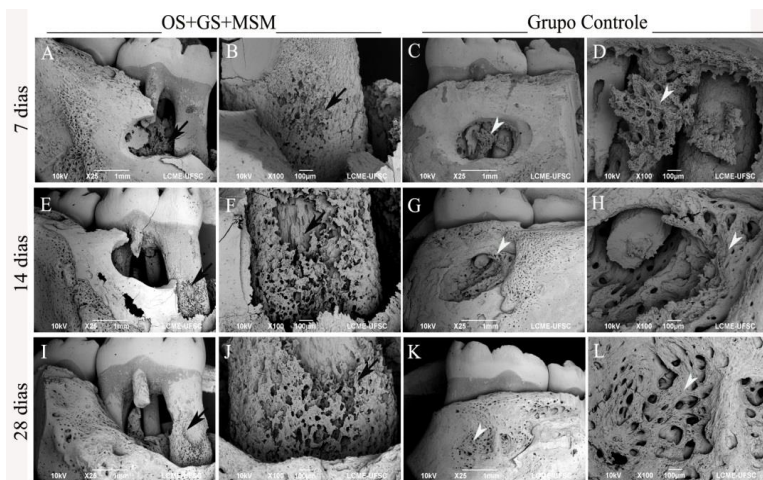


Figura 4. Análise de microscopia eletrônica de varredura (MEV). A, B, E, F, I e J: SO + SG + MSM; C, D, G, H, K e L: grupo controle. (B) Imagem de ampliação mais elevada de (A); (D) Imagem de ampliação mais elevada de (C); (F) Imagem de ampliação mais elevada de (E); (H) Imagem de ampliação mais elevada de (G); (J) Imagem de ampliação mais elevada de (I); (L) Imagem de maior ampliação de (K). (seta preta) área de reabsorção óssea; (seta branca) osso recém-formado

6. DISCUSSÃO

O silício orgânico, o sulfato de glucosamina e o MSM têm sido utilizados para o tratamento de doenças articulares ou distúrbios do tecido ósseo e chamam a nossa atenção devido aos resultados positivos relatados na formulação oral (Seaborn e Nielsen, 2002; Matheson e Perry, 2003; Bruyere *et al.*, 2004; Jugdaohsingh, 2007; Gregory *et al.*, 2008; Kim *et al.*, 2009; Kamel e El Morsy, 2013). No entanto, apesar dos benefícios da administração oral, neste estudo, uma aplicação local foi escolhida para administrar topicamente estes componentes em defeitos ósseos mandibulares e avaliar os efeitos diretamente no tecido ósseo. No entanto, apesar dos benefícios da administração oral, neste estudo, foi escolhido realizar uma aplicação local destes componentes em defeitos ósseos mandibulares e avaliar os efeitos diretamente no tecido ósseo. Uma vez que o silício orgânico já é utilizado na dieta e mostrou efeitos positivos no metabolismo do tecido ósseo e conjuntivo aumentando a densidade mineral óssea (Jugdaohsingh, 2007) e é utilizado na Odontologia como material de cobertura na superfície do implante (Hench *et al.*, 2004), foi escolhido uma combinação dos componentes com uma maior proporção (75%) de silício do que o sulfato de glucosamina (15%) e MSM (15%).

No teste de histocompatibilidade, uma análise global demonstrou que o composto SO+SG+MSM apresentou o mesmo padrão que o grupo controle: ausência de neutrófilos, eosinófilos e formação de abscessos no período analisado; diminuição no tecido de granulação e infiltrados de linfócitos ao longo do período observado; e um ligeiro processo inflamatório em 14 e 21 dias após a cirurgia. Assim, a composição de SO+SG+MSM foi utilizada em defeitos ósseos mandibulares em ratos.

No entanto, apesar do resultado positivo no teste de histocompatibilidade e nos relatos científicos, a composição de silício orgânico, sulfato de glucosamina e MSM, em vez da regeneração óssea, causou reabsorção óssea quando administrada localmente em defeitos ósseos mandibulares. De fato, este é o primeiro estudo a examinar a aplicação local desses componentes em associação para a regeneração óssea e, portanto, a comparação direta de nossos resultados com outros não pode ser feita facilmente. No entanto, alguns estudos podem nos direcionar para uma possível elucidação do resultado.

Mesmo com tantos relatos dos efeitos benéficos do silício orgânico, o processo de reabsorção encontrado neste estudo pode estar relacionado ao grau de toxicidade desse componente, o que tem sido

relatado na literatura. A inalação de sílica cristalina em partículas e silicatos em uma exposição de longo prazo provoca cicatrizes no pulmão, reduzindo a capacidade pulmonar, câncer de pulmão e o risco aumentado de tuberculose. Além disso, estes silicatos cristalinos são fagocitados por macrófagos que libertam citocinas e estimulam outras células imunitárias (Iler, 1979). Além disso, os altos níveis de silício em pacientes em hemodiálise crônica foram associados a doenças ósseas, nefropatia, neuropatia, doença torácica e doença hepática (Hosokawa *et al.*, 1990; Hosokawa e Yoshida, 1990; D'haese *et al.*, 1995). A estrutura óssea é mantida por um equilíbrio entre a formação óssea por osteoblastos e a reabsorção óssea por osteoclastos (Harada e Rodan, 2003) e, portanto, a alteração desse equilíbrio pode modificar a estrutura óssea. Quando usado em prescrição oral, o silício orgânico passará pela absorção intestinal e é metabolicamente processado antes de ser administrado aos tecidos e células, o que não ocorre quando é colocado diretamente no tecido. Assim, é possível que as partículas cristalinas do silício orgânico depositadas diretamente sobre o osso possam ter desencadeado uma importante reação inflamatória, atraindo células fagocitárias para a região e iniciado um intenso processo de reabsorção na tentativa de eliminar as partículas desse componente no osso.

Já as glucosaminas podem induzir a diferenciação de células de osteoblasto MC3T3-E1 em ratos (Igarashi *et al.*, 2011) e suprimir o ativador do receptor da expressão do factor nuclear kappa-B (RANKL) em células T CD3 e reabsorção óssea em modelo de osteoartrite induzida por collagenase em camundongos (Ivanovska e Dimitrova, 2011). *In vitro*, a combinação de MSM e BMP-2 aumentou o nível de expressão de genes marcadores de diferenciação de osteoblastos e, assim, pode promover a diferenciação de células-tronco mesenquimais em osteoblastos (Kim *et al.*, 2016). Em células humanas semelhantes a osteoblastos, o ácido ortossilícico a concentrações fisiológicas estimula a síntese do colágeno tipo 1 e melhora a diferenciação osteoblástica (Reffitt *et al.*, 2003). Além disso, em modelos animais, a ingestão de sulfato de glucosamina e silício orgânico aumenta a densidade mineral óssea (Jugdaohsingh, 2007; Asai *et al.*, 2016), com um efeito indireto da glucosamina na diferenciação de osteoclastos e inibição da ativação (Asai *et al.*, 2016). O silício orgânico também influencia o colágeno em diferentes estágios, enzimas formadoras de colágeno, deposição de colágeno e tem implicações na cicatrização e na formação óssea (Seaborn e Nielsen, 2002). Além disso, alguns trabalhos têm mostrado os efeitos anti-inflamatórios do sulfato de glucosamina e MSM (Kim *et al.*, 2009; Kamel e El Morsy, 2013), ou seja, ao que parece o sulfato de

glucosamina e o MSM possuem efeito positivo sobre células *in vivo*, não tendo um efeito tóxico sobre as mesmas.

Desta forma, pode-se pensar que o efeito de reabsorção intensa causado pela composição SO+SG+MSM possa ter sido causada pelo silício orgânico depositado diretamente sobre o osso. Porém, pelas limitações do estudo, responder claramente os motivos pelos quais as substâncias desencadearam um processo de reabsorção tão intenso no osso e superfícies radiculares. Para isto, seria necessário repetir o experimento isolando cada substância. Desta forma, poderíamos ter certeza de qual substância estaria provocando esta reação, ou até mesmo chegar à conclusão de que a associação destas é que desencadeou tal resposta.

7. CONCLUSÃO

Em conclusão, embora a composição de SO+SG+MSM tenha resultado favorável no teste de histocompatibilidade mostrando não haver diferença significativa entre as amostras da composição e do grupo controle nos tempos experimentais analisados, sua aplicação direta nos defeitos ósseos mandibulares de ratos causou reabsorção intensa. A princípio, a utilização da associação de SO+SG+MSM na concentração utilizada está descartada para aplicação direta objetivando a regeneração de defeitos ósseos.

REFERÊNCIAS

ASAI, H. et al. Glucosamines Attenuate Bone Loss Due to Menopause by Regulating Osteoclast Function in Ovariectomized Mice. **Biol Pharm Bull**, v. 39, n. 6, p. 1035-41, 2016. ISSN 1347-5215. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27251507> >.

BRUYERE, O. et al. Glucosamine sulfate reduces osteoarthritis progression in postmenopausal women with knee osteoarthritis: evidence from two 3-year studies. **Menopause**, v. 11, n. 2, p. 138-43, 2004 Mar-Apr 2004. ISSN 1072-3714. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15021442> >.

D'AMBROSIO, E. et al. Glucosamine sulphate: a controlled clinical investigation in arthrosis. **Pharmatherapeutica**, v. 2, n. 8, p. 504-8, 1981. ISSN 0308-051X. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7019929> >.

D'HAESE, P. C. et al. Increased silicon levels in dialysis patients due to high silicon content in the drinking water, inadequate water treatment procedures, and concentrate contamination: a multicentre study. **Nephrol Dial Transplant**, v. 10, n. 10, p. 1838-44, Oct 1995. ISSN 0931-0509. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8592591> >.

DE MENDONÇA COSTA, A. et al. Reconstruction of large cranial defects in nonimmunosuppressed experimental design with human dental pulp stem cells. **J Craniofac Surg**, v. 19, n. 1, p. 204-10, Jan 2008. ISSN 1049-2275. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18216690> >.

EPSTEIN, E. SILICON. **Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol**, v. 50, p. 641-664, Jun 1999. ISSN 1040-2519. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15012222> >.

FIGUEIREDO, J. A. et al. The histological effects of four endodontic sealers implanted in the oral mucosa: submucous injection versus implant in polyethylene tubes. **Int Endod J**, v. 34, n. 5, p. 377-85, Jul 2001. ISSN 0143-2885. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11482721> >.

GREGORY, P. J.; SPERRY, M.; WILSON, A. F. Dietary supplements for osteoarthritis. **Am Fam Physician**, v. 77, n. 2, p. 177-84, Jan 2008. ISSN 0002-838X. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18246887> >.

HARADA, S.; RODAN, G. A. Control of osteoblast function and regulation of bone mass. **Nature**, v. 423, n. 6937, p. 349-55, May 2003. ISSN 0028-0836. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12748654> >.

HENCH, L. L.; XYNOS, I. D.; POLAK, J. M. Bioactive glasses for in situ tissue regeneration. **J Biomater Sci Polym Ed**, v. 15, n. 4, p. 543-62, 2004. ISSN 0920-5063. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15212333> >.

HOSOKAWA, S.; OYAMAGUCHI, A.; YOSHIDA, O. Trace elements and complications in patients undergoing chronic hemodialysis. **Nephron**, v. 55, n. 4, p. 375-9, 1990. ISSN 1660-8151. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2392189> >.

HOSOKAWA, S.; YOSHIDA, O. Silicon transfer during haemodialysis. **Int Urol Nephrol**, v. 22, n. 4, p. 373-8, 1990. ISSN 0301-1623. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2228500> >.

HOSSAIN, M. Z.; KYOMEN, S.; TANNE, K. Biologic responses of autogenous bone and beta-tricalcium phosphate ceramics transplanted into bone defects to orthodontic forces. **Cleft Palate Craniofac J**, v. 33, n. 4, p. 277-83, Jul 1996. ISSN 1055-6656. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8827382> >.

IGARASHI, M.; SAKAMOTO, K.; NAGAOKA, I. Effect of glucosamine, a therapeutic agent for osteoarthritis, on osteoblastic cell differentiation. **Int J Mol Med**, v. 28, n. 3, p. 373-9, Sep 2011. ISSN 1791-244X. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21537831> >.

ILER, R. K. **The chemistry of silica: Solubility, polymerisation, colloid and surface properties, and biochemistry**. New York: John Wiley & Sons, 1979.

IVANOVSKA, N.; DIMITROVA, P. Bone resorption and remodeling in murine collagenase-induced osteoarthritis after administration of glucosamine. **Arthritis Res Ther**, v. 13, n. 2, p. R44, Mar 2011. ISSN 1478-6362. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21410959> >.

JUGDAOHSINGH, R. Silicon and bone health. **J Nutr Health Aging**, v. 11, n. 2, p. 99-110, Mar-Apr 2007. ISSN 1279-7707 (Print) 1279-7707 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17435952> >.

JUGDAOHSINGH, R. et al. Dietary silicon intake is positively associated with bone mineral density in men and premenopausal women of the Framingham Offspring cohort. **J Bone Miner Res**, v. 19, n. 2, p. 297-307, Feb 2004. ISSN 0884-0431. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14969400> >.

KAMEL, R.; EL MORSY, E. M. Hepatoprotective effect of methylsulfonylmethane against carbon tetrachloride-induced acute liver injury in rats. **Arch Pharm Res**, v. 36, n. 9, p. 1140-8, Sep 2013. ISSN 0253-6269. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23591777> >.

KIM, D. N. et al. Methylsulfonylmethane enhances BMP-2-induced osteoblast differentiation in mesenchymal stem cells. **Mol Med Rep**, v. 14, n. 1, p. 460-6, Jul 2016. ISSN 1791-3004. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27175741> >.

KIM, J. H. et al. Methylsulfonylmethane suppresses hepatic tumor development through activation of apoptosis. **World J Hepatol**, v. 6, n. 2, p. 98-106, Feb 2014. ISSN 1948-5182. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24575169> >.

KIM, Y. H. et al. The anti-inflammatory effects of methylsulfonylmethane on lipopolysaccharide-induced inflammatory responses in murine macrophages. **Biol Pharm Bull**, v. 32, n. 4, p. 651-6, Apr 2009. ISSN 0918-6158. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19336900> >.

MARX, R. E. Platelet-rich plasma: evidence to support its use. **J Oral Maxillofac Surg**, v. 62, n. 4, p. 489-96, Apr 2004. ISSN 0278-2391. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15085519> >.

MATHESON, A. J.; PERRY, C. M. Glucosamine: a review of its use in the management of osteoarthritis. **Drugs Aging**, v. 20, n. 14, p. 1041-60, 2003. ISSN 1170-229X. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14651444> >.

NAMPO, T. et al. A new method for alveolar bone repair using extracted teeth for the graft material. **J Periodontol**, v. 81, n. 9, p. 1264-72, Sep 2010. ISSN 1943-3670. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20476887> >.

REFFITT, D. M. et al. Orthosilicic acid stimulates collagen type 1 synthesis and osteoblastic differentiation in human osteoblast-like cells in vitro. **Bone**, v. 32, n. 2, p. 127-35, Feb 2003. ISSN 8756-3282. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12633784> >.

ROKN, A. et al. Histologic Evaluation of Bone Healing Following Application of Anorganic Bovine Bone and β -tricalcium Phosphate in Rabbit Calvaria. **J Dent (Tehran)**, v. 9, n. 1, p. 35-40, 2012. ISSN 2008-2185. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22924100> >.

SCHULZ, M. C. et al. Autogenous bone and a bovine bone substitute for ridge preservation - preliminary clinical and histologic findings. **Aust Dent J**, Mar 2015. ISSN 1834-7819. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25819677> >.

SEABORN, C. D.; NIELSEN, F. H. Silicon deprivation decreases collagen formation in wounds and bone, and ornithine transaminase enzyme activity in liver. **Biol Trace Elem Res**, v. 89, n. 3, p. 251-61, Dec 2002. ISSN 0163-4984 (Print) 0163-4984 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12462748> >.

SILVA JUNIOR, F. **Osteoartrite experimental em ratos: efeito de sulfato de glicosamina e sulfato de condroitina sobre a incapacitação articular e a lesão da cartilagem.** 2007. 84 (doutor). Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo

VERRIER, S. et al. Tissue engineering and regenerative approaches to improving the healing of large bone defects. **Eur Cell Mater**, v. 32, p. 87-110, Jul 2016. ISSN 1473-2262. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27434267> >.

YOSHIOKA, M. et al. Bone regeneration in artificial jaw cleft by use of carbonated hydroxyapatite particles and mesenchymal stem cells derived from iliac bone. **Int J Dent**, v. 2012, p. 352510, 2012. ISSN 1687-8736 (Electronic) 1687-8728 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22536240> >.

ANEXO 1 - Aprovação da pesquisa pelo Comitê de Ética em Pesquisa

PP00848

Título

METODOLOGIAS UTILIZADAS PELO GRUPO DE PESQUISA HISTOPATOLOGIA DA REGENERAÇÃO TECIDUAL

Data de Entrada

19/04/2013

Resultado:

Aprovado

Data/Prazo

01/11/2013

Considerações

Ofício nº 114/CEUA/PROPESQ/2013

Do: Presidente da Comissão de Ética no Uso de Animais- CEUA

Ao(à): Prof(a) Dr(a) Michelle Tilmann Biz, Departamento de Ciências Morfológicas - CCB

Prezado(a) Professor(a),

Em relação ao protocolo de pesquisa sob sua responsabilidade a CEUA deliberou o seguinte:

- APROVADO a inclusão de procedimento conforme solicitação anexa.

Adita-se o Ofício nº 041/CEUA/PROPESQ/2013

Do: Presidente da Comissão de Ética no Uso de Animais-CEUA

Ao(à): Prof(a) Dr(a) Michelle Tilmann Biz, Departamento de Ciências Morfológicas - CCB

Prezado(a) Professor(a),

Em relação ao protocolo de pesquisa sob sua responsabilidade a CEUA deliberou o seguinte:

- APROVADO, por quatro anos, para a utilização de quinhentos ratos (*Rattus Norvegicus*).

- Procedência do animal: Biotério Central - UFSC

Por ocasião do término desse protocolo, DEVERÁ SER APRESENTADO RELATÓRIO detalhado relacionando o uso de animais no Projeto desenvolvido aos resultados obtidos, conforme formulário ON LINE CEUA.

Atenciosamente,

Relatório Final previsto para (90 dias após término da vigência do protocolo ou no momento da apresentação de um novo protocolo)

Data 12/09/2017

Data 05/11/2013

Paracer(es):



Prof. Assoc. Carlos Rogério Tonussi, D.Sc.
COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS – PRPE – UFSC
PRESIDENTE